



(11) (21)

PI 9400068-9 AC12N 5/06,
A01N 1/02,
A61K 7/48

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
Ministério da Indústria, do Comércio e do Turismo
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(22) Data de Depósito: 11/01/94

(43) Data de Publicação: 26/09/95 (RPI 1295)

(54) Título: Processo de utilização da trealose para proteção e manutenção de microorganismos, células e tecidos de animais e vegetais e composição cosmética à base de trealose para proteção e manutenção de tecido humano

(71) Depositante(s): Universidade Federal do Rio de Janeiro (BR/RJ)

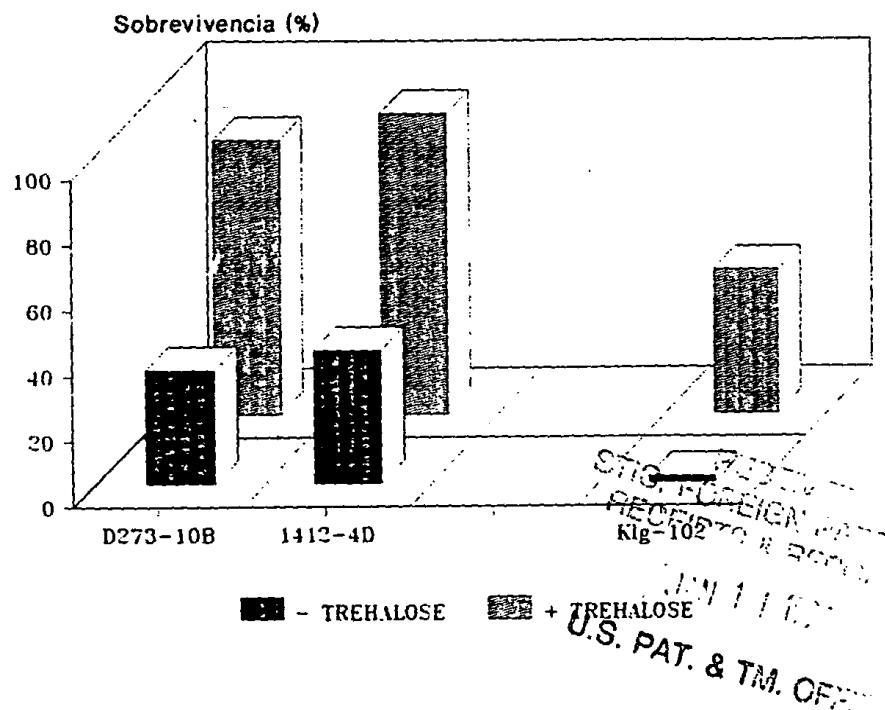
(72) Inventor(es): Anita Dolly Panek

(74) Procurador: Nilza Xavier Kover

(57) Resumo: Patente de Invenção de processo de utilização da trealose para proteção e manutenção de microorganismos, células e tecidos animais e vegetais e composição cosmética à base de trealose para proteção e manutenção de tecido humano. A presente invenção refere-se à descrição de um processo para proteção e manutenção da viabilidade e integridade celulares em condições de estresse, tais como, choque térmico, choque osmótico, congelamento, desidratação, congelamento e a exposição prolongada a altas concentrações de etanol, utilizando como protetor o dissacarídeo trealose. A presente invenção também descreve uma composição cosmética à base de trealose para proteção e manutenção de tecido humano. Trealose tem uma ampla aplicação na indústria fermentativa, produção de biomassa e nas áreas de pesquisa, médica, farmacológica, agrícola e cosmetológica.

DESIDRATAÇÃO

Figura 1



9400068

5 Relatório descritivo da patente de invenção para
PROCESSO DE UTILIZAÇÃO DA TREALOSE PARA PROTEÇÃO E
MANUTENÇÃO DE MICROORGANISMOS, CÉLULAS E TECIDOS DE
ANIMAIS E VEGETAIS E COMPOSIÇÃO COSMÉTICA À BASE DE
TREALOSE PARA PROTEÇÃO E MANUTENÇÃO DE TECIDO HUMANO.

A presente invenção refere-se à descrição de um processo para proteção e manutenção da viabilidade e integridade celular em condições de estresse, tais como choque térmico, choque osmótico, desidratação e altas 10 concentrações de etanol utilizando como protetor o dissacarídeo trealose, tendo ampla aplicação na indústria, pesquisa e nas áreas cosmetológica, médica e agrícola.

15 Na fermentação alcoólica existe uma série de fatores que afetam e influenciam a taxa fermentativa, como por exemplo, a densidade e a viabilidade celulares, a temperatura, a composição do meio, a fonte de carbono utilizada, a pressão osmótica e a concentração de etanol. Geralmente na fermentação de açúcares são utilizadas cepas que produzem de 4 a 9% (v/v) de etanol.

20 Nos últimos anos vem crescendo o interesse por fermentações de alta densidade. No entanto, altas concentrações de substrato prejudicam, tanto o crescimento celular, como a fermentação, devido à alta pressão osmótica e à baixa atividade da água. Além disso, o

etanol produzido inibe a capacidade de fermentação e reduz a viabilidade celular por provocar a extrusão de prótons e por atuar como um agente desidratante.

No Brasil, durante a produção de álcool combustível, 5 as células de levedura são recicladas várias vezes nos fermentadores, onde a temperatura sem um rigoroso controle, oscila na faixa de 35-40° C. Já na indústria cervejeira, durante o processo de maturação, células de levedura permanecem à concentração de 4-5% -(v/v) de 10 etanol a cerca de 4° C por várias semanas. Portanto, é necessária a proteção das células de levedura, sob tais condições adversas, para manutenção da qualidade da fermentação e do produto final. 10

Também na área de produção de leveduras de 15 panificação há grande interesse na obtenção de células com elevado teor de carboidratos e que sejam osmorresistentes, permitindo assim o uso do produto em massas com elevados teores de açúcares. Em adição, desde 1950, a indústria da panificação tem dispensado uma crescente atenção ao 20 congelamento de massas. A qualidade e estabilidade das massas congeladas depende primordialmente da capacidade de sobrevivência do fermento ao processo de congelamento e descongelamento. 2

Também a preservação de bancos genéticos de sementes 25 e microorganismos depende da manutenção da integridade da membrana celular durante a desidratação e posterior hidratação. A estabilidade de material biológico

desidratado tem despertado grande interesse pois facilita sua estocagem, por aumentar o tempo de vida até em prateleira e dificultar as chances de contaminação.

A presente invenção tem por objetivo minimizar os 5 problemas encontrados na manutenção da viabilidade celular em processos industriais acima mencionados utilizando-se o dissacarídeo trealose.

A trealose é um dissacarídeo não redutor formado por 2 unidades glicosídicas unidas através de uma ligação do 10 tipo a-1,1, rara na natureza, que coloca os anéis de glicose em planos diferentes.

Este dissacarídeo é amplamente distribuído na natureza sendo encontrado em fungos, bactérias, algas, insetos, crustáceos, nematôdeos, anelídeos e vegetais 15 superiores. Concentrações de trealose intracelular têm mostrado estar relacionadas com o acréscimo, na tolerância de muitos organismos diante de condições ambientais adversas. Experimentos indicam que a trealose é essencial na estabilização de membranas desidratadas em organismos 20 anidrobióticos. Como constatação, nesses organismos, capazes de sobreviver completamente desidratados por muito anos e de reassumir imediatamente suas atividades quando novamente hidratados, a trealose é encontrada em elevadas concentrações. Há também indicações de que a trealose 25 desempenha um papel protetor na osmorregulação, protegendo as células em condições de carência alimentar e aumentando a resistência celular a baixas e altas temperaturas.

Portanto, altos teores de trealose têm sido relacionados com o aumento da osmotolerância, termotolerância e tolerância ao etanol. Tal aumento na resistência celular às diversas condições de estresse, resultaria no aumento 5 da capacidade fermentativa das leveduras. 5

Trealose também preserva a atividade enzimática a altas temperaturas, sendo capaz de proteger e estabilizar biomoléculas e lipossomas liofilizados.

Mais recentemente, a trealose foi utilizada com 10 sucesso na conservação de pulmão para transplante. 10

Na criopreservação de células de plantas e de leveduras este açúcar tem se mostrado muito eficiente na manutenção da integridade celular. Nos processos de congelamento, trealose é um substituto qualificado do DMSO 15 (dimetil-sulfóxido), com a vantagem de não ser tóxico à célula nem ao ser humano, fator essencial nos transplantes. 15

É do conhecimento da técnica um processo para estabilização de biomoléculas, tais como enzimas, 20 anticorpos e antígenos, por desidratação à temperatura ambiente e à pressão atmosférica, utilizando trealose como protetor (Patente US 4,891,319). Porém, esta patente se restringe à preservação de biomoléculas, não se referindo a seres vivos. 20

25 Um outro processo de preservação trata da liofilização de células de mamíferos na presença de trealose (Patente 5,059,518). Nesse caso o processo de 25

desidratação descrito ocorre à baixa pressão (vácuo) e à baixa temperatura. Adicionalmente o objeto da invenção limita-se ao uso das células liofilizadas em métodos analíticos, como por exemplo, citometria de fluxo e
5 ensaios imunológicos.

O presente processo caracteriza-se pela busca de melhores alternativas para proteção e manutenção da integridade de microorganismos e de células e tecidos de animais e plantas durante condições adversas, tais como,
10 desidratação, exposição a altas temperaturas, congelamento, choque osmótico e permanência a elevadas concentrações de etanol. O método, ora proposto, de preservação celular baseia-se na utilização de trealose sintetizada intracelularmente ou adicionada
15 artificialmente. A presente invenção refere-se também a uma composição cosmética à base de trealose para proteção e manutenção de tecido humano.

A invenção metodológica para preservação celular é operacionalizada como a seguir descrito:

20 Para obtenção de microorganismos desidratados e viáveis na células, são cultivadas em condições ideais de crescimento e coletadas na 2ª fase estacionária de crescimento, centrifugadas e lavadas duas vezes com água destilada contendo de 5 a 25% de trealose. A seguir, de
25 100 a 150 mg de células (peso seco) são ressuspensas em 0,5 ml de água destilada contendo de 5 a 25% de trealose. As células são transferidas para pequenas placas metálicas

recobertas com papel de filtro e desidratadas em estufa a temperaturas que variam de 30 a 37° C por um período de tempo de 1 a 10 dias até atingir-se peso constante. A reativação das células desidratadas ocorre pela adição de 5 água destilada contendo de 5 a 25% de trealose. A temperatura do processo de hidratação situa-se na faixa de 36 a 40° C. 5

Para obtenção de microorganismos congelados e viáveis, as células são tratadas como descrito no processo 10 de desidratação. O processo de congelamento ocorre pela redução gradual da temperatura. As células coletadas por centrifugação são ressuspensas em água destilada contendo 10 de 5 a 25% de trealose e transferidas para tubos Eppendorf. Os tubos são imersos no gelo por 30 a 40 15 minutos e a seguir colocados em uma câmara especial recoberta com lã e gaze contendo nitrogênio líquido, de modo que a temperatura caia para -1 a -2° C por minuto. Quando a temperatura atinge -20° C os tubos são estocados 15 no freezer a -20° C. Para descongelamento das células, os 20 tubos são imersos em banho-maria, de temperatura na faixa de 32 a 37° C. 20

Para obtenção de microorganismos mais resistentes aos efeitos danosos causados pela exposição a altas temperaturas ou a altas pressões osmóticas, ou de elevadas 25 concentrações de etanol, as células são submetidas a um tratamento térmico anterior. Assim, células cultivadas em condições de crescimento na presença de glicose são 25

coletadas na metade da 1a. fase exponencial do crescimento. A seguir a cultura de células é transferida para banho-maria ajustado para temperatura na faixa de 37 a 41° C e agitadas a 160 rpm por 1 hora para acúmulo de trealose intracelular.

A metodologia descrita para obtenção de células de microorganismos viáveis após os processos de congelamento, e descongelamento também pode ser estendida a células e tecidos animais e vegetais.

Para criopreservação de células e tecidos animais e vegetais, as células são cultivadas em condições ideais. A seguir uma amostra de células ou tecidos é coletada e ressuspensa em uma solução isotônica contendo de 5 a 25% de trealose. As células ou tecidos são transferidos para recipientes fechados e colocados no gelo por 30 a 40 minutos. O processo de congelamento das células e tecidos ocorre pela redução gradual da temperatura em câmara especial, revestida de lã e gaze contendo nitrogênio líquido. O decaimento da temperatura deve ser de -1 a -2° C por minuto. Quando a temperatura atinge -35° C os recipientes são imersos diretamente no nitrogênio líquido a -196° C. Para descongelamento das células e tecidos animais e vegetais, os recipientes são colocados em banho-maria à temperatura na faixa de 32 a 37° C.

Em extensão a trealose pode ser empregada para preservação da pele humana mantendo sua integridade durante processos desidratantes. O método assim proposto

emprega a adição de trealose em cosméticos a uma concentração de 1 a 25% de peso, baseado no total de peso do cosmético. A forma de apresentação da composição cosmética pode ser: batons, cremes, loções e outros.

5 Os exemplos a seguir ilustram melhor a invenção:

Exemplo 1 : Preservação de células de levedura durante a desidratação.

As cepas de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas no experimento estão caracterizadas na tabela a seguir:

10	Cepa	Características	Fonte
	D273-10B	Controle	J.R.Matton, U.Colorado, USA
	1412-4D	Controle	E.Smaal, Giat Brocades, Holanda
	Klg-102	Não acumula trealose	D.Fraenkel, Harvard, USA

As células crescidas em meio líquido YED (2,0% de glicose, 1,3% de extrato de levedo, 0,2% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 0,2% de KH_2PO_4 , pH 5,2) a 28° C e 160 rpm foram coletadas em fase estacionária por centrifugação e lavadas 2 vezes com água destilada contendo, ou não, 10% de trealose.

Amostras de 100 mg (peso seco) foram ressuspensas em 0,5 ml de água destilada contendo, ou não, 10% de trealose e desidratadas em placas metálicas forradas com papel de filtro em estufa a 30° C por 24 horas até peso constante.

Para determinação da resistência das células ao processo, a viabilidade foi determinada antes e após a desidratação.

25 Utilizou-se a técnica de plaqueamento em meio sólido YPD (2,0% de glicose, 1,0% de extrato de levedo, 2,0% de peptona e 2,0% de agar) após ressuspensão das células e

subseqüente diluição em água contendo, ou não, 10% de trealose. O processo de reativação ocorreu a 40° C. Os resultados (figura 1) mostram que, se trealose é adicionada, externamente ocorre um incremento significativo na capacidade de sobrevivência das células ao processo de desidratação. A cepa mutante, incapaz de sintetizar trealose intracelularmente, tornou-se resistente à desidratação somente após a adição de trealose.

Exemplo 2 : Prevervação de células de levedura submetidas a elevadas temperaturas.

As cepas de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas no experimento estão caracterizadas na tabela a seguir:

Cepa	Características	Fonte
D273-10B	Controle	J.R.Matton, U.Colorado, USA
131	Controle	K.Tatchell, U.Pensilvania, USA
KLG-102	Não acumulada trealose	D.Fraenkel, Harvard, USA
VFP21-8C	Segregante obtida da KLG-102 que acumula trealose	Obtida em nosso laboratório

As células crescidas em meio líquido YED a 28° C e 160 rpm foram coletadas na metade da primeira fase exponencial do crescimento. Metade da cultura foi transferida para banho-maria a 40° C por 1 hora e agitada a 160 rpm para indução do acúmulo de trealose e a seguir submetida ao choque térmico a 50,5° C por minutos. A outra metade da cultura foi diretamente transferida de

28 C para 50,5° C. Para avaliação da termotolerância as células foram apropriadamente diluídas e plaqueadas em meio sólido YPD. A trealose intracelular foi extraída de 12 mg de células (peso seco) com ácido tricloroacético 0,5 M a 0° C por 20 minutos e dosada pelo método da antrona. Os resultados (figura 2) mostram que o tratamento térmico a 40° C por 1 hora, onde ocorre o acúmulo de trealose, fez com que as células adquirissem termotolerância, já que as células pré-tratadas a 40° C apresentaram-se mais resistentes ao choque térmico que aquelas diretamente expostas a 50,5° C. A segregante obtida da cepa mutante Klg-102, capaz de acumular trealose após o tratamento a 40° C, apresentou um aumento de 72% na capacidade de sobrevivência ao choque térmico, enquanto que a cepa mutante original (Klg-102), incapaz de acumular trealose, mostrou apenas 40% de viabilidade.

Exemplo 3 : Preservação de células submetidas a altas pressões osmóticas.

A cepa de *Saccharomyces cerevisiae* D273-10B foi crescida em meio líquido YED a 28° C e 160 rpm e coletadas na metade da primeira fase de crescimento exponencial. Metade da cultura foi transferida para 40° C e agitadas a 160 rpm. A seguir as células foram coletadas por centrifugação, lavadas 2 vezes com água destilada gelada e 70 mg (peso seco) foram reinoculados em 100 ml de meio líquido YED contendo 20% de glicose, ou em 100 ml de meio YED contendo 18% de Sorbitol. As culturas foram incubadas

a 28° C e 160 rpm durante 24 horas. Para determinação da resistência das células ao processo, a viabilidade foi determinada antes e após ao choque osmótico utilizando-se a técnica de plaqueamento. A trealose interna foi extraída e dosada como descrito no exemplo anterior. Os resultados (figura 3) demonstram que as células submetidas ao tratamento térmico a 40° C, que provoca a indução do acúmulo de trealose, apresentaram-se mais resistentes a altas pressões osmóticas.

Exemplo 4 : Preservação de células de leveduras expostas a 10% de etanol por 24 horas.

As cepas de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas no experimento estão caracterizadas na tabela a seguir.

Cepa	Características	Fonte
D273-10B	Controle	J.R.Matton, U.Colorado, USA
S288C	Controle	E.Cabid, N.I.H., USA
K1g-102	Não acumula trealose	D.Fraenkel, Harvard, USA
Q6R2	Não acumula trealose	Obtida em nosso laboratório

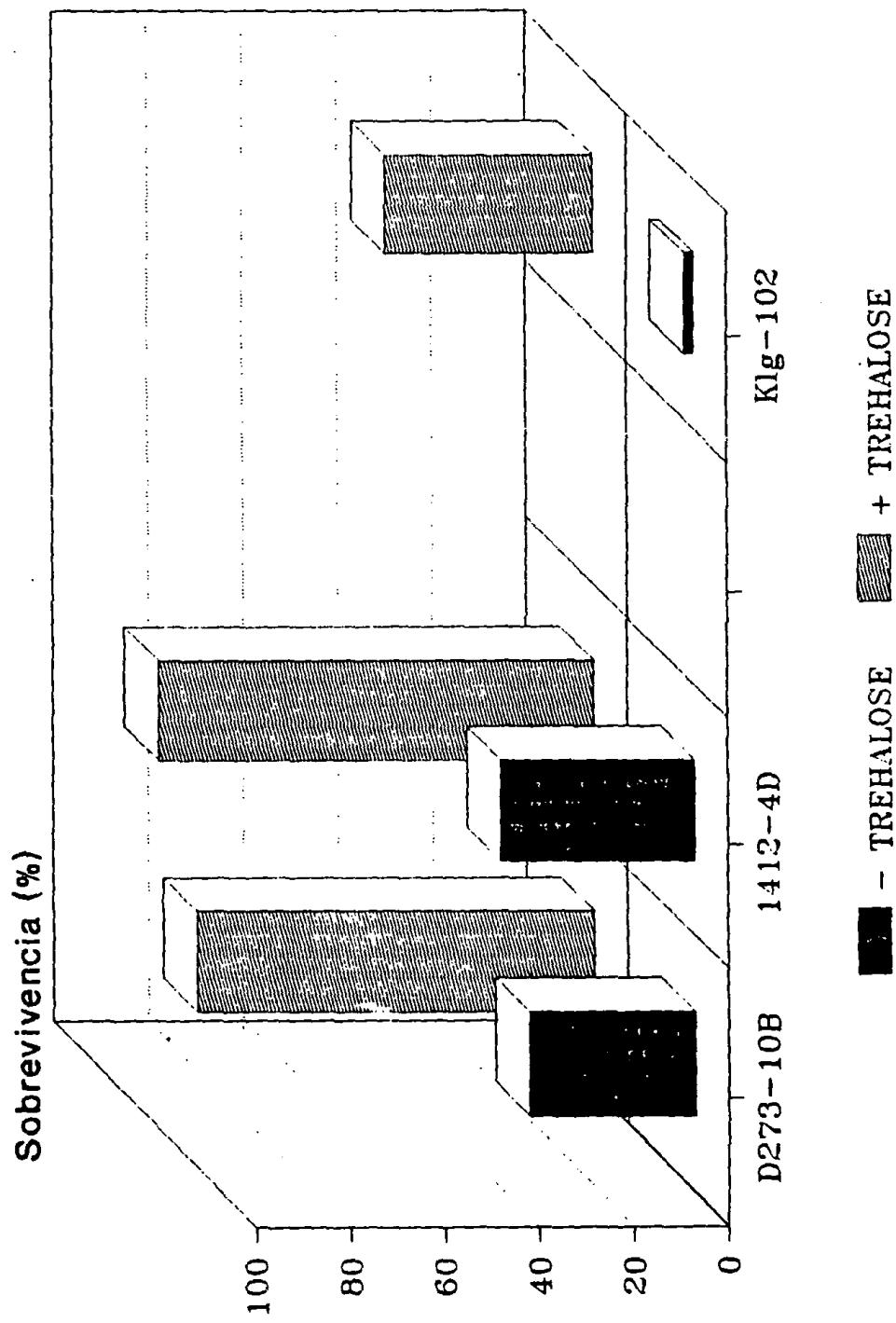
As células crescidas em meio líquido YED a 28° C e 160 rpm foram coletadas na metade da primeira fase exponencial do crescimento. Metade da cultura foi submetida a um tratamento térmico a 40° C e agitada a 160 rpm por 1 hora. A seguir, foi adicionado etanol absoluto às culturas, de modo que a concentração final fosse de 10%. As culturas foram então incubadas a 28° C e 160 rpm durante 24 horas. Os resultados (figura 4)

mostram que a trealose acumulada intracelularmente aumenta a resistência aos efeitos danosos causados pela exposição prolongada ao etanol. As cepas incapazes de sintetizar trealose (Klg-102 e Q6R2) apresentaram uma baixa 5 sobrevivência (cerca de 15%) após o processo.

Como acima exposto, a presente invenção pode ser utilizada em diversos setores industriais e acadêmicos destacando-se, porém não no sentido mais limitativo, os 10 seguintes campos de aplicação: indústria fermentativa, produção de biomassa, cosmetológica, pesquisa aplicada, agricultura, área médica e farmacológica.

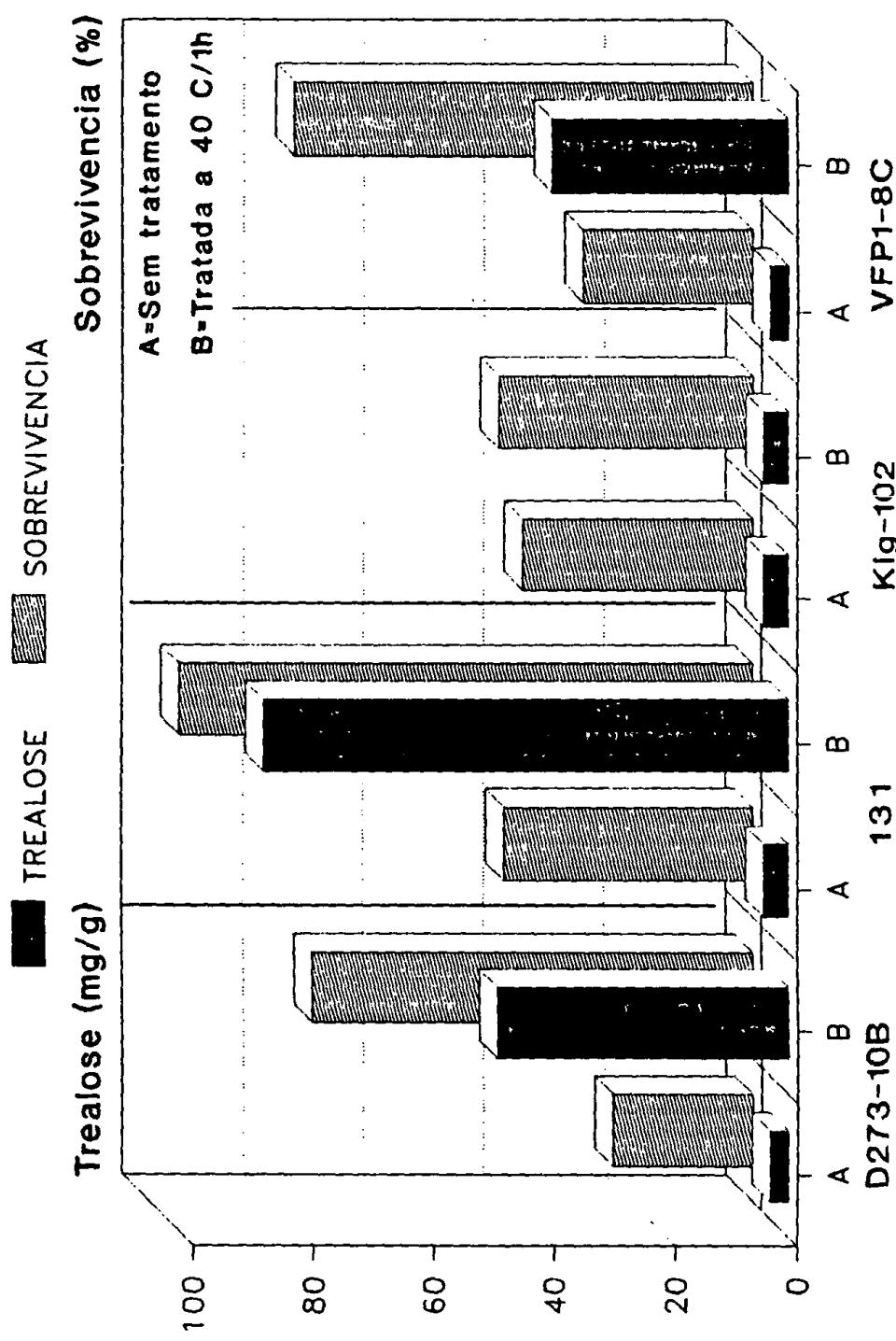
DESIDRATAÇÃO

Figura 1



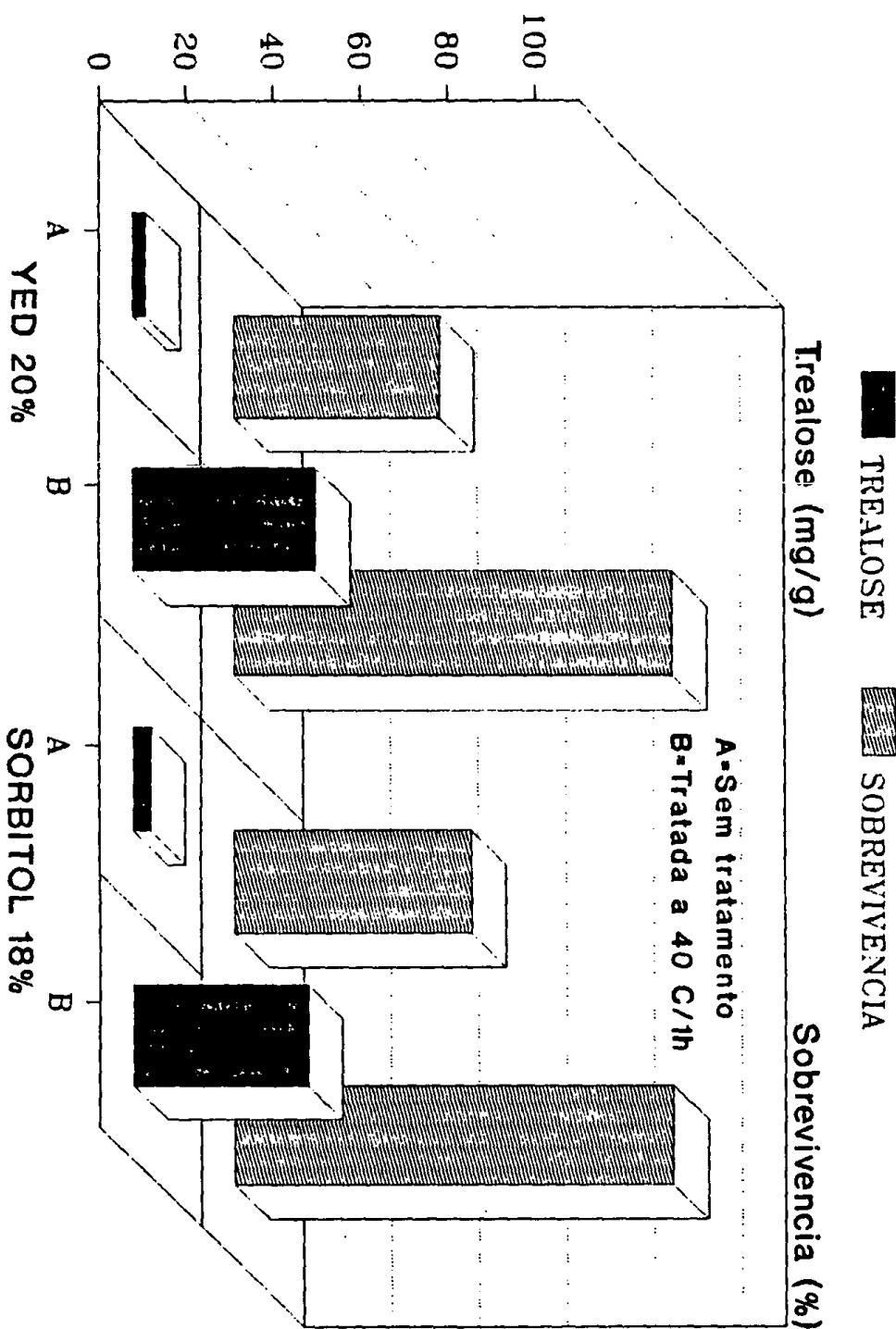
CHOQUE TERMICO

Figura 2



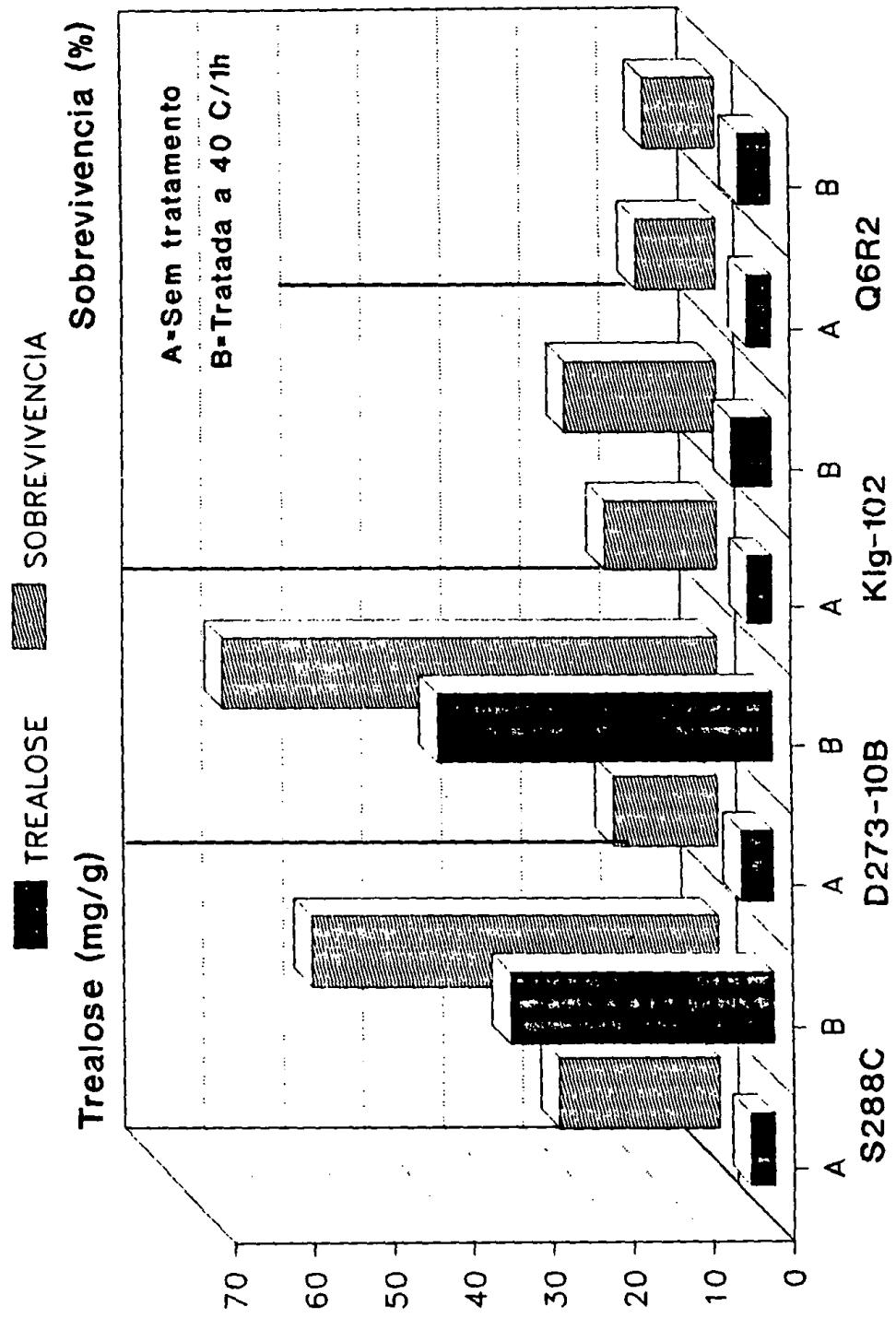
CHOQUE OSMOTICO

Figura 3



EXPOSIÇÃO A 10% ETANOL

Figura 4



REIVINDICAÇÕES

- 1) Processo de utilização da trealose para proteção e manutenção de microorganismos caracterizado pelas seguintes etapas:
 - a) Cultiva-se as células de microorganismos em condições ideais de crescimento;
 - b) Coleta-se as células obtidas em (a) na segunda fase estacionária de crescimento por centrifugação;
 - c) Lava-se as células em (b) por duas vezes consecutivas com água destilada contendo de 5 a 25% de trealose;
 - 10 d) Retira-se uma amostra das células de (c) contendo de 100 a 150 mg de células (peso seco) e ressuspende-se em 0,5 ml de água destilada contendo de 5 a 25% de trealose por 60 minutos obtendo-se um pelete úmido;
 - e) Transfere-se o pelete em (d) para pequena placa metálica recoberta com papel de filtro e, posteriormente, a referida placa é colocada em estufa numa faixa de temperatura que varia de 30 a 37° C;
 - 15 f) Desidrata-se o pelete obtido em (e) por um período de tempo de 1 a 10 dias até atingir peso constante;
 - g) Reativa-se o pelete obtido em (f) adicionando-se água destilada contendo de 5 a 25% de trealose deixando-se por

60 minutos a temperatura de 36 a 40° C até obter-se um pelete reidratado.

2) Processo de utilização de trealose para proteção e manutenção de microorganismos de acordo com a

5 reivindicação (1) caracterizado pelo fato de se obter peletes de células de microorganismos desidratados e peletes de células de microorganismos reidratados.

3) Processo de utilização da trealose para proteção e manutenção de microorganismos caracterizado pelas

10 seguintes etapas:

a) Cultiva-se as células de microorganismos em condições ideais de crescimento;

b) Coleta-se as células obtidas em (a) na segunda fase estacionária de crescimento por centrifugação;

15 c) Lava-se as células obtidas em (b) por duas vezes consecutivas com água destilada contendo de 5 a 25% de trealose;

d) Retira-se uma amostra das células de (c) contendo de 100 a 150 mg de células (peso seco) e ressuspende-se em 20 0,5 ml de água destilada contendo de 5 a 25% de trealose por 60 minutos obtendo-se um pelete úmido;

e) Transfere-se o pelete obtido em (d) para tubos Eppendorf e posteriormente o referido tubo é colocado no gelo por 30 a 40 minutos;

25 f) Transfere-se o tubo (e) para uma câmara especial recoberta com lã e gaze contendo nitrogênio líquido, de modo que a temperatura decresça à taxa de -1 a -2° C por

5

10

15

20

25

minuto até a temperatura atingir -20° C;

g) Submete-se o tubo (f) à -20° C no freezer;

h) Reativa-se o pelete obtido em (g) transferindo-se para banho-maria na faixa de temperatura entre 32 a 37° C.

4) Processo de utilização da trealose para proteção e manutenção de microorganismos de acordo com a reivindicação (3) caracterizado pelo fato de se obter peletes de células de microorganismos descongelados.

5) Processo de utilização da trealose para proteção e manutenção de microorganismos caracterizado pelas seguintes etapas:

a) Cultiva-se as células de microorganismos em condições ideais de crescimento e na presença de glicose;

b) Coleta-se as células obtidas em (a) na metade da primeira fase exponencial do crescimento;

c) As células obtidas em (b) são submetidas a um banho de temperatura na faixa de 37 a 41° C e agitadas a 160 rpm por 60 minutos obtendo-se um acúmulo de trealose intracelular;

6) Processo de utilização da trealose para proteção e manutenção de microorganismos de acordo com a reivindicação (5) caracterizado pelo fato de se obter células de microorganismos resistentes a altas temperaturas, altas pressões osmóticas e elevadas concentrações de etanol.

7) Processo de utilização da trealose para proteção e manutenção de células e tecidos animais e vegetais

caracterizado pelas seguintes etapas:

a) Cultiva-se as células e tecidos em condições ideais;

b) Coleta-se uma amostra de células e tecidos obtidos em
(a) e ressuspende-se em uma solução isotônica contendo de

5 5 a 25% de trealose;

c) Transfere-se as células e tecidos obtidos em (b) para
recipientes fechados e posteriormente os referidos
recipientes são colocados no gelo por 30 a 40 minutos;

10 d) Transfere-se os recipientes (c) para uma câmara
especial recoberta com lã e gaze contendo nitrogênio
líquido, de modo que a temperatura decresça à taxa de -1 a
-2° C por minutos

e) Submete-se os recipientes (d) a -196° C em nitrogênio
líquido;

15 f) Reativa-se as células e tecidos obtidos em (e)
transferindo-se para banho-maria na faixa de temperatura
entre 32 e 37° C.

8) Processo de utilização da trealose para proteção e
manutenção de células e tecidos animais e vegetais de
acordo com a reivindicação (7) caracterizado pelo fato de
20 se obter células e tecidos animais e vegetais congelados e
descongelados.

9) Composição cosmética à base de trealose para proteção
e manutenção de tecido humano caracterizado pelo fato de
se adicionar de 1 a 25% de trealose baseado no peso total
25 da composição cosmética.

9400068

29

RESUMO

Patente de invenção de processo de utilização da trealose para proteção e manutenção de microorganismos, células e tecidos animais e vegetais e composição cosmética à base de trealose para proteção e manutenção de tecido humano.

A presente invenção refere-se à descrição de um processo para proteção e manutenção da viabilidade e integridade celulares em condições de estresse, tais como, choque térmico, choque osmótico, congelamento, desidratação, congelamento e a exposição prolongada a altas concentrações de etanol, utilizando como protetor o dissacarídeo trealose. A presente invenção também descreve uma composição cosmética à base de trealose para proteção e manutenção de tecido humano. Trealose tem uma ampla aplicação na indústria fermentativa, produção de biomassa e nas áreas de pesquisa, médica, farmacológica, agrícola e cosmetológica.